

**Aus dem Pathologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Mikrofluorometrische Untersuchungen
über den Alternsprozeß in der Mäuseleber**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen**

**vorgelegt von
Karlheinz Himmelsbach
Lahr/Schwarzwald**

Mainz 1974
VERLAG



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pathologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Mikrofluorometrische Untersuchungen
über den Alternsprozess in der Mäuseleber

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Karlheinz Himmelsbach

Lahr/Schwarzwald

Mainz 1974



Dekan: Prof. Dr. R. Wolf
Referent: Prof. Dr. J. Löhr
Korreferent: Prof. Dr. W.E.G. Müller

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methode	4
Ergebnisse	9
Diskussion	35
Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	44
Lebenslauf	55

EINLEITUNG

Das Altern differenzierter fixiert postmitotischer Zellen als genetisches Programm oder "Anhäufung von Fehlern" im Verlaufe der Transkriptions- und Translationsprozesse wird von einer Verminderung der Regenerations- und Adaptationsfähigkeit auf endogene und exogene Belastungen begleitet (COMFORT 1968; v. HAHN 1968). Diese äußert sich in einer fortschreitenden Reduktion der Biosyntheseraten wichtiger zellulärer Enzyme. Demgegenüber treten bei mitotefähigen Zellen, allen Epithelien und Zellen des reticulo-endothelialen Systems keine derartig einschneidenden funktionellen Alternerscheinungen auf. An der Leber als einem fakultativ postmitotischen Organ, fand HRACHOVEC (1969) eine Verminderung der proteinsynthetisierenden Aktivität der Zellen bei 17 bis 22 Monate alten Ratten gegenüber 2 bis 3 Monate alten Tieren. DETWILER und DRAPER (1962) stellten eine alternersabhängige Dezimierung zytoplasmatischer RNA-Fraktionen in der Leber fest. Der Verlust an proteinsynthetisierendem Potential und die Reduktion des RNA-Gehaltes weisen bei DNA-Konstanz der diploiden Interphasekerne (DENKHAUS 1970; FALZONE, BARROWS und SCHOCK 1959) darauf hin, daß die primären Alternerscheinungen der Zelle in biochemisch und physikalisch erfaßbaren Umstrukturierungen im Desoxyribonucleoproteinkomplex (DNP) zu suchen sind. Dabei handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine qualitative Veränderung genetischer Information, sondern um eine Blockierung genetischer Regulationsmechanismen auf dem Niveau der Transkription. Das würde zu einem relativen Verlust der für die Zelle verfügbaren Information führen (v. HAHN 1970; COMFORT 1970). Als Ursache für diesen Informationsschwund führt VERZAR (1971) eine alternersabhängige Vernetzung der DNA-Makromoleküle an. Diese soll

durch neu gebildete kovalente Bindungen zwischen den einzelnen DNA-Polynucleotidketten oder zwischen der DNA-Doppelhelix und den adäquaten Kerneiweißkörpern erfolgen. Eine experimentelle Unterstützung erfährt die Theorie von VERZAR durch den Nachweis einer alternsabhängigen Steigerung der Thermostabilität der DNA (v. HAHN 1963 a,b; 1964/65 a,b; v. HAHN und FRITZ 1966; BONNER und HUANG 1963). Auf molekularer Ebene können diese Befunde durch qualitative Verfestigung und Vermehrung kovalenter Bindungen zwischen den Phosphatgruppen der DNA-Moleküle beziehungsweise aktiver Gruppen der Pyrimidin- und Purinkörper einerseits und den basischen Aminosäuren Arginin, Histidin, Lysin der Histone andererseits erklärt werden (v. HAHN 1968; DENKHAUS und HEIMER 1970; LÖHR et al. 1972). Diese weitgehende Verfestigung der Watson-Crick-Spirale kann auch Ursache für die von DENKHAUS et al. (1969) in Abhängigkeit vom Individualalter nachgewiesene unterschiedliche Säurelabilität des Chromatins sein.

Die Struktur des Nukleoproteidkomplexes, in welchem die regelmäßig entlang der Polynukleotidketten angeordneten DNA-Phosphatgruppen mit Histonkomponenten assoziiert sind (MEDVEDEV 1964), weist auf die besondere Bedeutung der wahrscheinlich in allen eukaryotischen Kernen vorkommenden basischen Eiweißkörper im Rahmen der Alternsprozesse und vermutlich auch im Rahmen der pathologischen Alterung hin. Nach Untersuchungen von JAKOB und MONOD (1961), HUANG und BONNER (1962), BONNER (1965), ALLFREY et al. (1963), BARR et al. (1963), VOROBYEV (1969) sowie RICHARDS und PARDON (1970), besitzen die Histone nicht nur reprimierende Fähigkeiten, sondern schützen auch die Struktur der DNA-Doppelhelix.

Das morphologische Äquivalent dieser alternstypischen physikochemischen Umstrukturierung der genetischen Matrix

zeigt sich in einer alternsabhängigen Verschiebung im eu- und heterochromatischen Anteil des Nukleoproteids zugunsten der stark kondensierten, vermutlich irreversiblen Heterochromatinfractionen (ANDREW 1962; DENKHAUS et al. 1969; SANDRITTER 1970; BENEKE, ERVIG und SCHMITT 1970). Die Heterochromatisierung mit Reduktion der Anzahl sogenannter freier, negativ geladener Phosphatgruppen innerhalb des DNP-Komplexes (GLEDHILL et al. 1966) führt zu einer vermutlich irreversiblen funktionellen Blockierung dieser für die Regulation des Informationsflusses wichtigen DNA-Bestandteile. Gleichzeitig wird das morphologisch faßbare Phänomen der Polyploidie, 1925 von JAKOBJ erstmals beschrieben, in zahlreichen Untersuchungen in einen Zusammenhang mit dem Altern gebracht. Ein alternsabhängiger Anstieg der tetra- und höherploidien somatischen Zellkerne wurde sowohl in der Rattenleber (NAORA 1957; ALFERT und GESCHWIND 1958; NADAL und ZEJDELA 1966) als auch in der menschlichen Leber beobachtet (SWARTZ 1956; ALTMANN et al. 1966 b; DENKHAUS 1970). Über die Mechanismen ihrer Entstehung herrscht jedoch noch Uneinigkeit. Diskutiert wird eine endomitotische Polyploidisierung (MÜLLER 1964) und Störungen im Ablauf der Karyokinese (HIMES et al. 1957; BEAMS et al. 1942).

Die alternsabhängigen Veränderungen der strukturellen Beziehungen zwischen den biologischen Makromolekülen, insbesondere im Nukleoproteinkomplex der Chromosomen, sollen in der vorliegenden Untersuchung anhand der Feulgen-, Fastgreen-, Phenanthrenchinon- und Acridinorangefärbung dargestellt werden.

MATERIAL UND METHODE

Materialgewinnung

Der Untersuchung dienten Leberzellkerne von insgesamt 18 weiblichen und männlichen Albino-Mäusen im Alter von 2, 14 und 22 Monaten. Das Lebendgewicht betrug bei den 14 und 22 Monate alten Tieren 50g, bei den 2 Monate alten Tieren 18g. Als durchschnittliches Lebergewicht wurde bei den 22 Monate alten Tieren 2,52g, bei den 14 Monate alten Tieren 2,26g und bei den 2 Monate alten Tieren 0,78g registriert. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation in vier aufeinanderfolgenden Serien. Nach Entnahme der Leber wurde von der sagitalen Schnittfläche des linken Leberlappens mit einem geschliffenen Objektträger ein Zellabstrich vorgenommen. Anschließend wurden die abgestrichenen Zellen zwischen zwei gereinigten Objektträgern zerquetscht und mit der Kante eines Objektträgers auf einem zweiten, fluoreszenzfreien (Firma Kindler, Freiburg i.Brsg.) ausgestrichen. Pro Tier wurden in der beschriebenen Weise 12 Ausstriche hergestellt. Nach 10 min Lufttrocknung wurden diese bis zu den Färbungen in 10%-igem, neutral gepuffertem Formalin bei +4,0 Grad Celsius im Kühlschrank (Phenanthrenchinon) gelagert. Ein Teil der Präparate wurde einer 1-stündigen Fixierung in 96%-igem Äthanol (Feulgen und Fastgreen FCF) unterzogen und anschließend ebenso wie die für die Acridinorange-Reaktion vorgesehenen Präparate bei -6,0 Grad Celsius trocken über Silikagel aufbewahrt. Die Fixierungsdauer betrug maximal 12 Stunden.

Färbungen

Die histochemische Färbung erfolgte mit jeweils zwei Präparaten von Tieren aus den drei Altersklassen.

Folgende Färbungen wurden ausgeführt:

- I. die Acridin-Orange-Färbung nach der von RIGLER (1966) inaugurierten Methode:
 1. Pyridin wasserfrei 5 min;
 2. Pyridin: Essigsäureanhydrid 3:2 15 min;
 3. Äthanol 100%; 96%; 60%; 30%; jeweils 5 min;
 4. Aqua bidest 3 min;
 5. Citrat- Na_2HPO_4 -Puffer pH 4,1 5 min;
 6. Citrat- Na_2HPO_4 -Puffer pH 4,1 und AO 10^{-4}m 15 min;
 7. Citrat-Phosphat-Puffer pH 4,1 3 x jeweils 5 min.
- II. die Phenanthrenchinon-Färbung nach der von MAGUN und KELLY (1969) angegebenen Methode:
 1. Wässern der formalinfixierten Ausstrichpräparate für eine Stunde;
 2. Alkohol 70%-ig 5 min;
 3. Alkohol 100%-ig abs. 5 min;
 4. Xylol 5 min;
 5. Alkohol 100%-ig abs. 3 x 1 min;
 6. Färbung mit Phenanthrenchinon 10 min, das folgendermaßen frisch zubereitet wurde:
2,0 ml 5 nNaOH, 18,0 ml Aqua dest., 80,0 ml Äthanol 100%-ig; hinzugegeben wurden 200,0 mg Phenanthrenchinon in 20,0 ml Dimethylformamid;
 7. Äthanol 100%-ig 3 x 1 min;
 8. Alkohol 70%-ig 5 min;
 9. Alkohol 30%-ig 5 min;
 10. Aqua dest. 5 min.

III. die Fastgreen-FCF-Färbung nach der von NOESKE (1968) angewandten Methode:

1. Nachfixierung der Ausstrichpräparate in neutral gepuffertem 10%-igem Formalin 60 min;
2. Wässern der formalinfixierten Präparate 2h;
3. Hydrolyse mit 5%-iger Trichloressigsäure bei 90 Grad Celsius;
4. Alkohol 70%-ig 2 x 10 min;
5. Spülen in Aqua dest. pH 8,1 (mit NaOH eingestellt) 10 min;
6. Färbung mit 0,1%-iger wässriger Fastgreen-Lösung pH 8,1 30 min;
7. Differenzieren in alkalischem Aqua dest. pH 8,1 (mit NaOH eingestellt) 3 x 1 min;
8. Aqua dest. pH 6,5 (mit 0,1 N HCl eingestellt) 2 x 1 min;
9. Äthanol 100%-ig abs. 1 min;
10. Xylol 1 min.

IV. die Feulgen-Nucleal-Reaktion nach der von D. MÜLLER (1966) beschriebenen Methode:

1. Hydrolyse in 1N HCl bei 60 Grad Celsius 12 min;
2. Schiff'sches Reagenz;
3. SO₂ Wasser 3 x 10 min;
4. Äthanol 30%-ig; 60%-ig; 70%-ig; 96%-ig jeweils 3 min;
5. Xylol 5 min.

Eingedeckt wurden die Präparate der AO-Färbung in Citrat-Phosphat-Puffer pH 4,1 unter Belastung mit 2 x 10 g, die Präparate der Phenanthrenchinon-Färbung mit einer frisch zubereiteten Lösung aus 9 Teilen Glycerin und 2 Teilen 5N NaOH.

Demgegenüber erfolgte die Eindeckung der Präparate aus der Fastgreen FCF- und Feulgen-Färbung mittels Cargille-Oil, das einen Brechungsindex von $n = 1,54$ aufweist (Firma R.P. Cargille Laboratories Inc. Cedar Grove N.J. USA).

Mikrofluorometrische Messungen

Die mikrofluorometrischen Messungen wurden mit einem Mikroskopphotometer mit variabler Meßblende, MPV I, durchgeführt (Firma Leitz, Wetzlar). Der Aufbau erfolgte im wesentlichen nach BÖHM und SPRENGER (1968).

Durchlicht zur Objekteinstellung: Phasenkontrast (Kondensor nach HEINE, 1931); Ölimmersionsobjektiv Pv Fl 70 x N.A. 1,15; Niedervoltlampe mit 5 V. Die Ausbleichung wurde durch Vorschaltung eines Interferenzbandfilters 618 +22 niedrig gehalten.

Optische Einrichtung: Ploem-Opak, Objektiv PvFl 70 x wie oben. Die Anregung des gebundenen Farbstoffs erfolgte durch einen Xenon Höchstdruckbrenner XBO, 150 W (Firma Osram Berlin); Gleichrichtervorschaltgerät Typ VX 150f-2b-1 unter Vorschaltung eines Spannungskonstanthalters Typ EMK Vx (Dominit), beide Geräte Firma Siemens, Erlangen.

Wärmeschutzfilter BG 38, Zerstreuungsfiler NG₁, Erregerfilter für Acridinorange und Phenanthrenchinon UG₁, für Feulgen und Fastgreen FCF BG_{12/3}; Sperrfilter für die Acridinorange-Färbung 510 nm, für die Phenanthrenchinon-Färbung 470 nm, für die Feulgen-Färbung 550 nm und für die Fastgreen FCF-Färbung 610 nm. Interferenzbandverlaufsfilter Veril a, Typ B-6 bei AO 2,6; PQ 1,6; Feulgen 3,6; Fastgreen FCF 4,1 (alle Filter Firma Schott und Gen., Mainz).

Die Messung erfolgte mit monochromatischem Licht für die AO-Färbung bei 530 nm, für die PQ-Färbung bei 490 nm, für die Feulgen-Färbung bei 570 nm und für die Fastgreen FCF-Färbung bei 620 nm. Meßeinrichtung S-20 Photokathode Typ 95 58A (Firma EMI, England). Spektrale Empfindlichkeit siehe DENKHAUS und HEIMER (1970). Lichtmeßeinrichtung Typ MFLK BN 5007 (Firma Knott, München).

Die Saugspannung betrug für die Acridinorange- und Phenanthrenchinon-Färbung 1,1 kV, für die Feulgen-Färbung 1,3 kV und für die Fastgreen FCF-Färbung 1,4 kV. Als Meßinstrument diente ein Mikroamperemeter mit einem Meßbereich von 0,0018 - 20 μ A/Skt.. Gemessen wurde bei allen vier Färbungen bei 0,002 μ A. (Firma Norma, Wien, Österreich).

Pro Präparat, außer den Präparaten I, II, III der Färbeserie I der Fastgreen FCF-Färbung mit jeweils nur 100 gemessenen Kernen, wurden 200 Leberzellkerne ausgewertet. Die Messung der Leberzellkerne erfolgte rein zufällig ohne Berücksichtigung der jeweiligen Kernklasse. Dabei wurde zunächst der Meßwert des Kernes ermittelt, wovon ein sog. Leerwert des den Kern umgebenden Milieus subtrahiert wurde.

Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines programmierten Tischrechners (Programma Olivetti 101).

Das vorliegende Programm berechnet:

1. Mittelwert $\bar{x} = (\sum_{i=1}^n x_i) / n$

2. Standardabweichung $s = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 / (n-1)} = \sqrt{(\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum_{i=1}^n x_i)^2) / (n-1)}$

3. Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}} = s / \sqrt{n}$

Programm der statistischen Auswertung
mit Mittelwert, Standardabweichung und
Standardabweichung des Mittelwertes.

ERGEBNISSE

Die zytophotometrischen Ergebnisse der Feulgen-Nukleal-Reaktion, welche eine quantitative Erfassung der intranukleären DNA ermöglicht, sind in Tabelle 1, 2 und 3 dargestellt. Die in Tab. 1 aufgeführten mittleren Extinktionswerte mit Standardabweichungen und Standardabweichungen des Mittelwertes für die Altersklasse der 2 Monate alten Mäuse bewegen sich in der diploiden Kernklasse zwischen 10 AE und 12 AE. Daneben erscheinen verhältnismäßig wenig tetraploide Kerne, deren mittlere Meßwerte zwischen 19 AE und 21 AE liegen. Darüber hinaus sind ein oktoploider und zwei hypertetraploide Kerne wiedergegeben, so daß man bei den 2 Monate alten Mäusen von einem relativ monotonen diploiden Kernbild sprechen kann.

In Tab. 2 sind die mittleren Extinktionswerte für die Altersklasse der 14 Monate alten Tiere aufgeführt, die für die diploiden Kerne zwischen 14 AE und 16 AE aufweisen. Die zytophotometrische Auswertung der tetraploiden Leberzellkerne ergab mittlere Meßwerte zwischen 30 AE und 31 AE. In zunehmendem Maße treten hier auch oktoploide Kerne mit Werten zwischen 60 AE und 61 AE und 16-ploide Kerne mit mittleren Werten zwischen 119 AE sowie 121 AE auf. Bemerkenswert ist die Interposition von hyperdiploiden und hypertetraploiden Zwischenklassen. Im Gegensatz zu dem monotonen diploiden Kernbild der 2 Monate alten Mäuse präsentiert sich hier ein polymorphes Ploidieklassenprofil aus diploiden, tetraploiden, oktoploiden, 16-ploiden, hyperdiploiden und hypertetraploiden Kernen.

Tab. 3 erfaßt die mittleren Extinktionswerte der 22 Monate alten Mäuse. Für die diploide Kernklasse ließen sich mittlere Werte zwischen 14 AE und 16 AE messen

Tier Nr.	Probe- Serie	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
1	IV	2c	188	11,5	1,6	0,2	Hyper 2c				
2			190	11,3	1,5	0,1					
3			190	11,5	1,5	0,2					
4			191	11,7	1,5	0,1					
5			189	11,4	1,4	0,1					
III	I		183	10,6	2,1	0,2					
1	IV	4c	12	20,1	0,8	0,3	Hyper 4c				
2			10	20,0	0,8	0,3					
3			10	19,4	0,9	0,3					
4			9	19,7	0,9	0,3					
5			11	19,4	0,9	0,3					
III	I		14	20,0	1,0	0,3		2	29,5	0,8	0,5
1	IV	8c					Hyper 8c				
2											
3											
4											
5											
III	I		1	40							
1	IV	16c									
2											
3											
4											
5											
III	I										
1	IV	32c									
2											
3											
4											
5											
III	I										

Tab. 1:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)
 von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE
 (1 AE = 2×10^{-3} μ A bei 570 nm)
 Altersklasse: 2 Monate
 Färbung: Feulgen-Nukleal-Reaktion

Tier Nr.	Färbeserie	Kernklasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kernklasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
A	II	2c	73	15,2	1,2	0,2	Hyper 2c				
II			56	15,1	1,3	0,2		2	23,5	0,8	0,5
III			62	15,2	1,1	0,2		3	22		
IV			50	15,2	1,3	0,2					
VII	III		77	15,3	1,6	0,2		2	23		
VIII			69	14,9	1,2	0,2		1	22		
A											
A	II	4c	108	30,6	1,4	0,2	Hyper 4c	3	47,3	0,6	0,4
II			126	30,8	1,5	0,2					
III			119	30,2	1,3	0,2		2	48,5	0,8	0,5
IV			128	30,6	1,8	0,2					
VII	III		104	30,3	1,9	0,2		1	40		
VIII			114	30,3	1,7	0,2					
A											
A	II	8c	10	60,6	0,7	0,3	Hyper 8c				
II			12	60,4	0,7	0,2					
III			7	60,3	0,5	0,2					
IV			15	61,0	0,7	0,2					
VII	III		10	60,8	0,9	0,3					
VIII			13	60,2	0,6	0,2					
A											
A	II	16c	6	119,8	0,8	0,4					
II			4	119,8	0,5	0,3					
III			7	119,6	0,6	0,2					
IV			7	120,3	0,5	0,2					
VII	III		6	120,2	0,8	0,4					
VIII			3	120,3	0,6	0,4					
A											
A	II	32c									
II											
III											
IV											
VII	III										
VIII											
A											

Tab. 2:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)
 von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE
 (1 AE = 2×10^{-3} μ A bei 570 nm)
 Altersklasse: 14 Monate
 Färbung: Feulgen-Nukleal-Reaktion

Tier Nr.	Ferbe- Serie	Kern- Klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
I	I	2c	10	15,2	1,0	0,3	Hyper 2c	3	20,7	1,2	0,7
II			7	15,6	0,8	0,3		5	21,0	1,3	0,6
I			12	14,8	1,1	0,3					
II			10	15,1	0,8	0,3		3	21,7	1,2	0,7
III			14	15,4	1,1	0,3					
IX		7	15,4	1,0	0,4		6	20,8	1,0	0,4	
I	I	4c	155	30,5	2,3	0,2	Hyper 4c	3	47,3	0,6	0,4
II			141	30,6	2,1	0,2		3	40,3	0,6	0,4
I			168	30,7	2,1	0,2		3	40,3	0,6	0,4
II			162	30,1	2,0	0,2					
III			148	30,4	2,3	0,2		6	40,7	0,6	0,3
IX		157	30,5	1,7	0,2						
I	I	8c	22	59,8	1,0	0,2	Hyper 8c				
II			33	60,1	1,2	0,3		2	69,5	0,8	0,5
I			13	60,0	0,7	0,2		1	70,0		
II			16	59,8	0,9	0,3					
III			25	60,1	1,6	0,3		2	74,0		
IX		23	59,9	1,2	0,3						
I	I	16c	6	120,0	0,6	0,3					
II			9	119,3	1,0	0,4					
I			3	117,7	0,6	0,4					
II			7	119,9	0,7	0,3					
III			4	120,3	0,5	0,3					
IX		4	119,3	1,0	0,5						
I	I	32c	1	238,0							
II											
I											
II			2	238,5	0,8	0,6					
III			1	236,0							
IX		3	237,7	0,6	0,4						

Tab. 3:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)
 von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE
 (1 AE = 2×10^{-3} μ A bei 570 nm)
 Altersklasse: 22 Monate
 Färbung: Feulgen-Nukleal-Reaktion

In der die diploide Regelklasse mit einer Anzahl $n = 60$ zahlenmäßig übertreffenden tetraploiden Klasse mit $n = 931$ zeigen sich mittlere Extinktionswerte zwischen 30 AE und 31 AE. Die Floidieklasse der oktoploiden Kerne bringt mittlere Werte zwischen 59 AE und 61 AE. Neben den 16-ploiden Kernen mit mittleren Extinktionswerten zwischen 117 AE und 121 AE erkennt man in dieser Altersklasse erstmals auftretende 32-ploide Kerne mit mittleren Extinktionswerten zwischen 236 AE und 239 AE. Die hyperploiden Kerne nehmen nicht nur zahlenmäßig zu, sondern es wird eine neue hyperploide Zwischenklasse, die hyperoktoploiden Kerne, interponiert.

Die zytophotometrischen Ergebnisse der Fastgreen FCF-Färbung, welche eine selektive Anfärbung der nukleären basischen Histone erlaubt, sind in Tab. 4, 5 und 6 aufgezeichnet.

Die in Tab. 4 zusammengefaßten mittleren Fluoreszenzemissionen für die Altersgruppe der 2 Monate alten Mäuse liegen für die diploide Kernklasse zwischen 7 AE und 8 AE. In dem nur gering ausgeprägten tetraploiden Kernkollektiv registriert man mittlere Extinktionswerte zwischen 15 AE und 17 AE. Da außer einem hypertetraploiden Kern keine Meßwerte einer höherploiden Kernklasse apparent wurden, bietet sich bei den 2 Monate alten Mäusen, parallel zur Feulgen-Nukleal-Reaktion, wiederum ein monotones Kernbild, in welchem die diploide Regelklasse das hervorragende Merkmal bildet.

Die Meßwerte der 14 Monate alten Mäuse sind in Tab. 5 wiedergegeben. Man stellt für die diploiden Kerne Werte zwischen 10 AE und 12 AE fest. Die zytophotometrische Auswertung der tetraploiden Zellkerne führte zu mittleren Meßwerten zwischen 20 AE und 21 AE.

Tier Nr.	Färb- Serie	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
1	IV	2c	188	7,7	0,8	0,1	Hyper 2c				
2			189	7,8	0,7	0,1					
3			189	7,7	0,6	0,1					
4			190	7,7	0,7	0,1					
5			190	7,7	0,7	0,1					
III	I		94	8,0	1,6	0,2					
1	IV	4c	12	15,6	0,6	0,2	Hyper 4c				
2			11	16,3	0,5	0,2					
3			11	16,4	0,6	0,2					
4			10	15,6	0,6	0,2					
5			10	15,6	0,6	0,2					
III	I		5	16,8	0,8	0,4		1	24		
1	IV	8c					Hyper 8c				
2											
3											
4											
5											
III	I										
1	IV	16c									
2											
3											
4											
5											
III	I										
1	IV	32c									
2											
3											
4											
5											
III	I										

Tab. 4:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)
 von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE
 (1 AE = 2×10^{-3} uA bei 620 nm)
 Altersklasse: 2 Monate
 Färbung: Fastgreen-Reaktion

Tier Nr.	Färbeserie	Kernklasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kernklasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
A	II	2c	75	10,3	1,2	0,2	Hyper 2c				
II			51	10,1	1,0	0,2					
III			48	10,2	1,0	0,2					
IV			74	11,2	1,9	0,3					
VII	III		58	10,7	1,5	0,2					
VIII			63	11,1	1,7	0,3					
A	II	4c	106	20,1	1,2	0,2	Hyper 4c				
II			130	20,1	1,2	0,2					
III			133	20,1	1,2	0,1					
IV			110	20,6	1,7	0,2					
VII	III		123	20,1	1,6	0,2					
VIII			121	20,7	1,6	0,2					
A	II	8c	15	39,7	0,8	0,2	Hyper 8c				
II			15	40,2	0,7	0,2					
III			17	39,4	1,1	0,3					
IV			13	40,0	0,9	0,3					
VII	III		11	38,5	0,7	0,3					
VIII			12	42,3	0,5	0,2					
A	II	16c	4	80,3	0,5	0,3					
II			4	79,8	0,5	0,3					
III			2	80							
IV			2	79							
VII	III		8	81,0	0,6	0,2					
VIII			4	82,0	0,9	0,5					
A	II	32c									
II											
III											
IV			1	156							
VII	III										
VIII											

Tab. 5:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)
 von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE
 (1 AE = 2×10^{-3} uA bei 620 nm)
 Altersklasse: 14 Monate
 Färbung: Fastgreen-Reaktion

Neben einer Zunahme der tetraploiden Zahl von $n = 59$ bei den 2 Monate alten Tieren auf $n = 723$ bei den 14 Monate alten Mäusen lassen sich hier erstmals oktoploide und 16-ploide Kerne mit mittleren Meßwerten zwischen 38 AE und 43 AE bei den oktoploiden bzw. 79 AE und 82 AE bei den 16-ploiden Kernen bestimmen. Ein solitär auftretender 32-ploider Kern mit einem Meßwert von 156 AE unterstreicht die Tendenz zur Ausbildung höherer Ploidiegrade mit zunehmendem Alter. Der Feulgen-Nukleal-Reaktion angepaßt, demonstriert sich das Kernbild der 14 Monate alten Mäuse auch in der Fastgreen-FCF-Färbung wesentlich breiter angelegt als das der 2 Monate alten.

Tab. 6 gibt die mittleren Extinktionswerte für die Altersgruppe der 22 Monate alten Mäuse wieder, welche für die diploide Kernklasse zwischen 10 AE und 12 AE betragen. Wie bei der Feulgen-Nukleal-Reaktion ist bei den 22 Monate alten Mäusen in der Fastgreen FCF-Färbung das zahlenmäßige Verhältnis diploid : tetraploid zugunsten der tetraploiden Kerne verschoben. Für letztere resultieren mittlere Extinktionswerte zwischen 19 und 21 AE. Oktoploide und 16-ploide Kerne weisen mittlere Extinktionswerte zwischen 37 und 41 AE bzw. zwischen 73 und 82 AE auf. Daneben lassen sich gegenüber den 14 Monate alten Mäusen in dieser Altersgruppe vermehrt 32-ploide Kerne mit mittleren Meßdaten zwischen 157 und 160 AE verifizieren. Die Resultate beider Nuclealreaktionen weisen eine enge Korrelation auf. Das wird besonders deutlich durch den Quotienten $\frac{F_1}{F_2} = \text{const.}$, wobei F_1 den Mittelwert der Feulgen-Extinktionen aller 2c Kerne innerhalb der jeweiligen Altersgruppe darstellt, F_2 den entsprechenden Wert für die Fastgreen-Färbung. Der Proportionalitätsfaktor beträgt für die 2 Monate alten Tiere 1,46, für die 14 Monate alten 1,42 und für die 22 Monate alten 1,41.

Tier Nr.	Färb- serie	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
I	I	2c	5	10,0	0,8	0,4	Hyper 2c				
II			4	10,3	1,0	0,5					
I			9	11,1	0,8	0,3					
II			6	11,0	0,7	0,3					
III	9		11,0	0,8	0,3						
IX	7		10,6	1,0	0,4						
I	I	4c	81	19,2	1,5	0,2	Hyper 4c				
II			86	20,0	1,5	0,2					
I			168	20,7	2,1	0,2					
II			159	20,6	2,1	0,2					
III	163		20,4	2,1	0,2						
IX	156		20,4	2,1	0,2						
I	I	8c	10	37,2	1,0	0,3	Hyper 8c				
II			8	40,9	0,9	0,3					
I			16	40,4	1,1	0,3					
II			23	40,6	1,0	0,3					
III	21		40,0	1,2	0,3						
IX	28		39,8	1,3	0,3						
I	I	16c	3	73,3	0,6	0,4					
II			2	78,5	0,8	0,5					
I			6	80,2	1,2	0,5					
II			9	82,0	1,0	0,4					
III	5		80,6	0,9	0,4						
IX	6		80,0	0,7	0,3						
I	I	32c	1	157							
II											
I			1	158							
II			3	158,7	0,6	0,4					
III	2		159,5	0,8	0,5						
IX	3		158,0	1,0	0,6						

Tab. 6:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)

von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE

(1 AE = 2×10^{-3} uA bei 620 nm)

Altersklasse: 22 Monate

Färbung: Fastgreen-Reaktion

Aus den Ergebnissen der Feulgen- und Fastgreen-Färbung (Tab. 1,2,3,4,5 und 6) ergibt sich ein Anstieg feulgen-markierter DNA bzw. fastgreen-markierter Histone zwischen dem 2. und 14. Lebensmonat bei gewahrter DNA- bzw. Histonkonstanz jenseits des 14. Lebensmonats. Neben der Beurteilung des DNA- und Histongehaltes eines spezifischen Kernkollektivs ermöglicht die Feulgen- bzw. Fastgreen-Reaktion die Darstellung der alternsabhängigen Polyploidisierung.

In Abb. 1 und 2 sind die Ploidieklassen-Histogramme dieser Färbungen wiedergegeben. Die einzelnen Altersgruppen der 2, 14 und 22 Monate alten Tiere werden durch jeweils 6 Mäuse repräsentiert. Als Referenzsystem dienen die in jedem Präparat sehr zahlreich vorhandenen homologen Lymphozyten. Drückt man gleichzeitig den Anteil der einzelnen Kernklassen an der Gesamtzahl der innerhalb einer Altersgruppe gemessenen Kerne in Prozenten aus (Tab. 7 und 8), überwiegen bei den 2 Monate alten Tieren mit 94,25 % (Feulgen) bzw. 94,55 % (Fastgreen) die diploiden Kerne, während das Kollektiv der tetraploiden Kerne wohl deutlich ausgebildet ist, jedoch nur 5,5 % (Feulgen) bzw. 5,36 % (Fastgreen) erreicht. Der Anstieg der tetraploiden Zahl (Feulgen 58 %; Fastgreen 60,25 %) bei den 14 Monate alten Mäusen korrespondiert mit der Verminderung der diploiden Kerne (Feulgen 32,25 %; Fastgreen 30,75 %). Die Verschiebung der Proportionen in den Ploidieklassen wird noch deutlicher bei den 22 Monate alten Tieren, wo nur noch 5 % (Feulgen) bzw. 4 % (Fastgreen) 2c-Kerne, 77,58 % (Feulgen) bzw. 81,3 % (Fastgreen) 4c-Kernen gegenüberstehen. Dabei treten mit zunehmendem Alter auch vermehrt höher- und hyperploide Kerne auf. Es dokumentiert sich eine alternsabhängige Polyploidisierung.

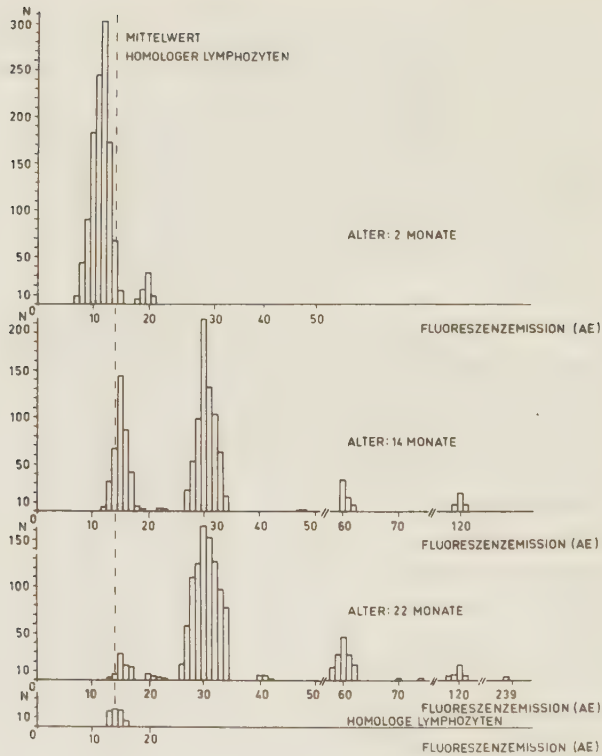


Abb. 1:

Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzemissionswerte von Mäuseleberzellkernen in drei Altersklassen und von homologen Lymphozyten.

Abszisse: Fluoreszenzemission in AE ($1 \text{ AE} = 2 \times 10^{-3} \mu\text{A}$)

Ordinate: Absolute Häufigkeit (N)

Färbung: Feulgen-Nukleal-Reaktion

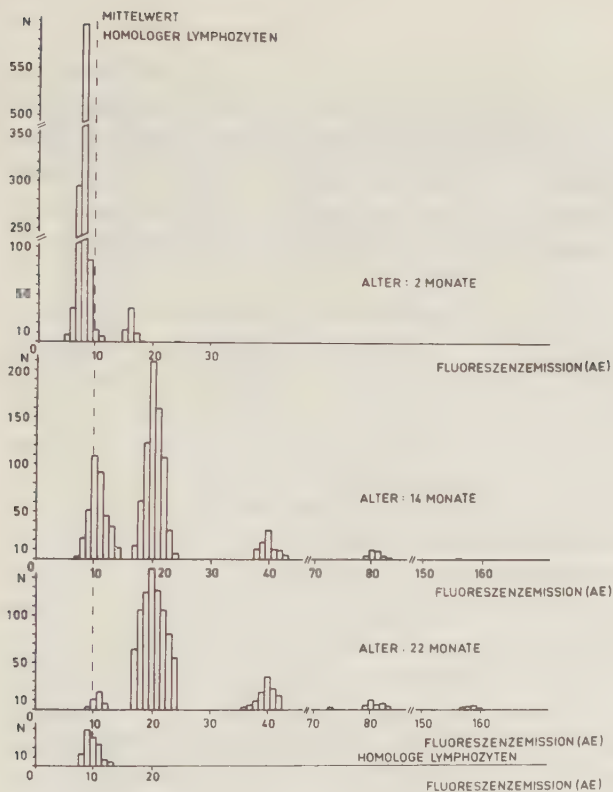


Abb. 2:

Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzemissionswerte von Mäuseleberzellkernen in drei Altersklassen und von homologen Lymphozyten.

Abszisse: Fluoreszenzemission in AE ($1 \text{ AE} = 2 \times 10^{-3} \mu\text{A}$)

Ordinate: Absolute Häufigkeit (N)

Färbung: Fastgreen-Reaktion

	2c	Hyper 2c	4c	Hyper 4c	8c	Hyper 8c	16c	32c	E
2 Monate	94,25		5,50	0,17	0,08				100
14 Monate	32,25	0,67	58,25	0,50	5,58		2,75		100
22 Monate	5,00	1,42	77,58	1,25	1,00	0,42	2,75	0,58	100

Tab. 7:

Prozentuale Verteilung der einzelnen Ploidie-
klassen in jeder Altersgruppe.

Färbung: Feulgen-Nukleal-Reaktion

	2c	Hyper 2c	4c	Hyper 4c	8c	Hyper 8c	16c	32c	E
2 Monate	94,55		5,36	0,09					100
14 Monate	30,75		60,25		6,92		2,00	0,08	100
22 Monate	4,00		81,30		10,60		3,10	1,00	100

Tab. 8:

Prozentuale Verteilung der einzelnen Ploidie-
klassen in jeder Altersgruppe.

Färbung: Fastgreen-Reaktion

Die gestrichelten Linien in Abb. 1 und 2 stellen die mittlere Extinktion homologer Lymphozyten dar. Aus ihrem Verlauf läßt sich der gegenüber dem diploiden Standard geringere Gehalt an Feulgen-markierter DNA bzw. Fastgreen-markierten basischen Histonen der Leberzellkerne der 2 Monate alten Tiere ablesen.

Um über eine quantitative Aussage hinaus auch Angaben über alternsabhängige funktionelle Veränderungen der DNA machen zu können, wurde der Feulgen-Färbung die Acridin-Orange-Reaktion angeschlossen, die eine Darstellung freier DNA-PO₄-Gruppen erlaubt. Die Ergebnisse sind in Tab. 9, 10 und 11 dargelegt.

Tab. 9 enthält die mittleren Extinktionswerte mit Standardabweichungen und Standardabweichungen des Mittelwertes der 2 Monate alten Tiere in einem Meßbereich von 2×10^{-3} μ A/Skt. bei 530 nm. Die mittleren Werte dieser Altersklasse erreichen für das diploide Kernkollektiv zwischen 15 AE und 17 AE. Die in geringer Zahl aufzufindenden tetraploiden Kerne lassen mittlere Extinktionswerte zwischen 31 AE und 34 AE erkennen. Daneben waren ein oktoploider und 6 hypertetraploide Kerne zu messen.

Die mittleren Fluoreszenzemissionen der 14 Monate alten Mäuse sind in Tab. 10 zusammengestellt. Für die diploiden Leberzellkerne sind mittlere Werte zwischen 30 AE und 33 AE wiedergegeben. Sie liegen damit deutlich über jenen der 2 Monate alten Tiere. Außerdem werden vermehrt tetraploide Kerne mit Meßwerten zwischen 58 AE und 63 AE apparent. Neben dem oktoploiden Kernkollektiv mit mittleren Extinktionswerten zwischen 118 AE und 121 AE lassen sich erstmals 16-ploide Kerne, für die sich Meßwerte zwischen 239 AE und 241 AE ergeben, in der Altersklasse der 14 Monate alten Mäuse bestimmen. Die in dieser Altersgruppe sonst häufigen hyperploiden Zwischenkerne konnten nicht nachgewiesen werden.

Tier Nr.	Färbeserie	Kernklasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	s $\bar{x}$	Kernklasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	s $\bar{x}$
1	IV	2c	185	16,5	1,6	0,2	Hyper 2c				
2			187	16,4	1,5	0,2		1	27		
3			183	16,3	1,6	0,2					
4			183	16,0	1,5	0,2					
5			184	15,5	1,6	0,2					
III	I		175	16,4	2,5	0,2					
1	IV	4c	15	31,9	1,4	0,4	Hyper 4c				
2			12	33,5	1,1	0,4					
3			16	31,3	1,2	0,3					
4			17	31,5	1,5	0,4					
5			16	32,2	1,0	0,3					
III	I		19	31,1	1,2	0,3		6	40,3	0,6	0,3
1	IV	8c					Hyper 8c				
2											
3			1	63							
4											
5											
III	I										
1	IV	16c									
2											
3											
4											
5											
III	I										
1	IV	32c									
2											
3											
4											
5											
III	I										

Tab. 9:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)
von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE

(1 AE = 2×10^{-3} uA bei 530 nm)

Altersklasse: 2 Monate

Färbung: Acridinorange bei pH 4,1 nach Acetylierung

Tier Nr.	Färbeserie	Kern-klass	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kern-klass	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
A	II	2c	63	32,4	1,6	0,2	Hyper 2c				
II			49	32,4	1,5	0,2					
III			53	30,7	1,4	0,2					
IV			71	30,3	1,3	0,2					
VII	III	2c	57	30,5	1,5	0,2	Hyper 2c				
VIII			69	30,7	1,6	0,2					
A			124	58,8	2,0	0,2					
II			138	62,2	1,7	0,2					
III	II	4c	132	60,1	1,8	0,2	Hyper 4c				
IV			107	60,1	1,3	0,2					
VII			129	60,0	1,4	0,2					
VIII			112	60,0	1,8	0,2					
A	II	8c	12	118,8	1,4	0,4	Hyper 8c				
II			7	119,9	0,8	0,2					
III			15	120,4	1,1	0,3					
IV			20	120,0	0,8	0,3					
VII	III	8c	8	119,7	0,5	0,2	Hyper 8c				
VIII			16	120,1	1,1	0,3					
A			1	239							
II			6	240,5	0,9	0,4					
III	II	16c									
IV			2	240							
VII			6	239,2	1,0	0,4					
VIII			3	239,7	0,6	0,4					
A	II	32c									
II											
III											
IV											
VII	III	32c									
VIII											
A											
II											

Tab. 10:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)
von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE

(1 AE = 2×10^{-3} uA bei 530 nm)

Altersklasse: 14 Monate

Färbung: Acridinorange bei pH 4,1 nach Acetylierung

Die in Tab. 11 aufgezeichneten mittleren Meßwerte für die Altersgruppe der 22 Monate alten Tiere führen für die diploide Kernpopulation zu Werten zwischen 23 AE und 26 AE. Das bedeutet eine gegenüber den 14 Monate alten Tieren verminderte Anfärbbarkeit der DNA-PO₄-Gruppen. Tetraploide Kerne, die in dieser Altersgruppe den Hauptanteil der Kerne stellen, weisen mittlere Extinktionswerte zwischen 49 AE und 51 AE auf. In zunehmendem Maße sind in dieser Altersgruppe auch oktoploide und 16-ploide Kerne mit Werten zwischen 99 AE und 101 AE bzw. zwischen 198 AE und 200 AE präsent. Daneben treten nicht nur 32-ploide Kerne mit Werten zwischen 396 AE und 398 AE auf, sondern man trifft auch Kerne hyperploider Zwischenklassen an.

Zusammenfassend findet man in der Acridinorange-Färbung eine alternsabhängige Variation der Farbstoffbindungs-kapazität, wobei diese zwischen dem 2. und 14. Lebensmonat ansteigt, um danach wieder abzufallen.

Den Befunden der Acridinorange-Färbung wird der histochemische Nachweis der argininreichen Histone zur Seite gestellt, um gleichzeitig ein mögliches Substrat alternsabhängiger Funktionsänderungen der genetischen Matrix quantitativ zu erfassen. Die Markierung der argininreichen Histone gelingt mit dem Farbstoff Phenanthrenchinon. Die zytophotometrischen Meßwerte dieser Färbung sind in Tab. 12, 13 und 14 abgebildet.

Tab. 12 betrifft die mittleren Extinktionswerte der 2 Monate alten Mäuse. Für die diploide Kernklasse erhält man mittlere Meßwerte zwischen 15 AE und 16 AE. In geringer Anzahl erkennt man tetraploide Kerne mit mittleren Werten zwischen 28 AE und 32 AE. Ganz vereinzelt wurden oktoploide, hyperdiploide und hypertetraploide Kerne gemessen.

Tier Nr.	Farbe Serie	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	
I	I	2c	5	23,8	0,9	0,4	Hyper 2c					
II				8	25,1	0,7		0,3	3	36,3	0,6	0,4
I			III	4	25,3	0,5		0,3	3	36,0	1,8	1,0
II				13	25,7	0,9		0,3	5	40,2	0,9	0,4
III	7			25,4	1,0	0,4	1	35				
IX	7			25,3	0,5	0,2	4	34,2	2,3	1,2		
I	I	4c	167	49,9	1,7	0,2	Hyper 4c					
II				153	50,8	1,6		0,2	2	69,5	0,8	0,5
I			III	171	50,0	1,5		0,2	3	69,3	0,6	0,4
II				148	50,2	1,2		0,1	3	73,7	0,6	0,4
III	167			50,5	1,5	0,2						
IX	158			49,9	1,8	0,2	4	73,0	2,0	1,0		
I	I	8c	23	100,1	0,7	0,2	Hyper 8c					
II				27	99,9	0,8		0,2				
I			III	18	99,9	0,8		0,2				
II				26	99,9	0,8		0,2				
III	23			100,0	0,8	0,2						
IX	21			100,1	1,0	0,3						
I	I	16c	4	199,0	0,9	0,5						
II				7	198,4	0,8		0,3				
I			III									
II				5	199,4	0,9		0,4				
III												
IX	6			200,0	0,9	0,4						
I	I	32c	1	397								
II												
I			III	1	398							
II												
III	2			396,0	1,5	1,0						
IX												

Tab. 11:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)
von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE

(1 AE = 2×10^{-3} μ A bei 530 nm)

Altersklasse: 22 Monate

Färbung: Acridinorange bei pH 4,1 nach Acetylierung

Tier Nr.	Färb- Serie	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
1	IV	2c	184	15,3	1,5	0,2	Hyper 2c				
2			191	15,7	1,6	0,2					
3			189	15,7	1,7	0,2					
4			190	15,3	1,6	0,2					
5			188	15,3	1,6	0,2					
III	I		173	15,9	1,9	0,2		5	25,2	0,5	0,2
1	IV	4c	14	28,6	1,4	0,4	Hyper 4c				
2			9	31,6	0,9	0,3					
3			11	31,7	1,0	0,3					
4			10	31,5	0,9	0,3					
5			12	31,8	1,1	0,3					
III	I		15	31,7	0,9	0,3		5	54,0	0,8	0,4
1	IV	8c	2	60,5	0,8	0,5	Hyper 8c				
2											
3											
4											
5											
III	I		2	64							
1	IV	16c									
2											
3											
4											
5											
III	I										
1	IV	32c									
2											
3											
4											
5											
III	I										

Tab. 12:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)
 von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE
 (1 AE = 2×10^{-3} μ A bei 490 nm)
 Altersklasse: 2 Monate
 Färbung: Phenanthrenchinon

Tab. 13 demonstriert die Ergebnisse der Altersgruppe der 14 Monate alten Tiere. Das diploide Kernkollektiv weist mittlere Werte zwischen 59 und 63 AE und somit eine drastische Erhöhung der Farbstoffbindungskapazität auf. Neben einer gegenüber den 2 Monate alten Tieren stark vergrößerten tetraploiden Kernpopulation mit mittleren Extinktionswerten zwischen 119 AE und 121 AE erscheinen auch vermehrt oktoploide Leberzellkerne mit mittleren Meßwerten zwischen 239 AE und 241 AE. Erstmals lassen sich 16-ploide Kerne mit mittleren Meßdaten zwischen 479 AE und 481 AE objektivieren. Darüber hinaus sind vermehrt hyperdiploide und hypertetraploide Kerne festzustellen.

Aus Tab. 14 lassen sich die mittleren Extinktionswerte der 22 Monate alten Tiere ablesen. Gegenüber den 14 Monate alten Tieren sind die diploiden Kerne nicht nur stark reduziert, sondern besitzen auch niedrigere mittlere Extinktionswerte zwischen 39 AE und 42 AE. Die am häufigsten anzutreffenden tetraploiden Kerne weisen mittlere Extinktionswerte zwischen 79 AE und 81 AE auf. Daneben fallen vermehrt oktoploide und 16-ploide Leberzellkerne mit Meßwerten zwischen 158 AE und 161 AE bzw. zwischen 319 und 320 AE an. Gleichfalls lassen sich häufiger hyperdiploide, hypertetraploide und hyperoktoploide Kerne nachweisen. Zum ersten Mal gewinnt man in der Altersgruppe der 22 Monate alten Mäuse auch 32-ploide Kerne mit mittleren Werten zwischen 634 AE und 640 AE.

Aus den Tabellen der Acridinorange- (Tab. 9, 10 und 11) und Phenanthrenchinon-Färbung (Tab. 12, 13 und 14) ist wie bei der Feulgen- und Fastgreen-Reaktion die alternsabhängige Polyploidisierung festzustellen.

Tier Nr.	Färb- Serie	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
A	II	2c	59	63,0	1,2	0,2	Hyper 2c	3	78,3	0,6	0,4
II			44	61,6	1,4	0,2		7	84,3	1,3	0,5
III			75	62,0	1,7	0,2					
IV			52	59,9	1,6	0,3		4	75,0	5,8	2,9
VII	III		65	60,2	1,4	0,2					
VIII			54	60,2	1,4	0,2		1	75		
A	II	4c	123	120,3	1,5	0,2	Hyper 4c				
II			135	120,0	1,2	0,1		3	160,3	0,6	0,4
III			101	119,9	1,5	0,2					
IV			129	119,3	1,3	0,2					
VII	III		109	119,2	1,7	0,2		1	140		
VIII			114	119,7	2,0	0,2					
A	II	8c	9	240,3	0,5	0,2	Hyper 8c				
II			7	239,9	0,4	0,2					
III			17	239,9	0,7	0,2					
IV			11	239,6	0,6	0,2					
VII	III		23	240,4	0,9	0,2					
VIII			22	239,5	1,0	0,3					
A	II	16c	6	480,3	0,6	0,3					
II			4	479,3	0,5	0,3					
III			7	480,1	0,7	0,3					
IV			4	479,8	0,5	0,3					
VII	III										
VIII			9	479,8	0,7	0,3					
A	II	32c									
II											
VII											
IV											
VII	III										
VIII											

Tab. 13:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)
 von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE
 (1 AE = 2×10^{-3} μ A bei 490 nm)
 Altersklasse: 14 Monate
 Färbung: Phenanthrenchinon

Tier Nr.	Färb- Serie	Kern- Klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kern- Klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
I	I	2c	4	40,3	0,5	0,3	Hyper 2c				
II			7	39,7	1,0	0,4		3	59,7	0,6	0,4
I	5		41,0	0,7	0,4	7		57,4	3,9	1,5	
II	13		40,4	0,9	0,3	4		54,8	0,5	0,3	
III	15		40,7	1,0	0,3	6		61,0	4,7	1,9	
IX	8		41,5	1,1	0,4	3		119,0	1,0	0,6	
I	I	4c	168	79,4	1,6	0,2	Hyper 4c	3	119,0	1,0	0,6
II			168	80,4	1,5	0,2		2	120		
I	160		79,9	1,7	0,2	4		119,8	0,5	0,3	
II	147		80,0	1,7	0,2						
III	156		80,1	1,4	0,2	7		122,9	4,9	1,9	
IX	138		79,5	1,7	0,2	5		102,6	0,6	0,3	
I	I	8c	17	160,1	0,7	0,2	Hyper 8c				
II			15	159,6	1,0	0,3					
I	26		160,6	1,0	0,2						
II	23		158,7	1,2	0,3						
III	15		160,1	0,9	0,3						
IX	25		159,6	1,0	0,2	1		258			
I	I	16c	6	319,0	1,3	0,6					
II			5	319,4	0,9	0,4					
I	4		319,3	1,0	0,5						
II	9		319,4	0,9	0,3						
III	3		320								
IX	14		319,9	0,9	0,3						
I	I	32c	2	634,5	0,8	0,5					
II											
I	1		635								
II	1		636								
III											
IX	3		639,3	0,6	0,4						

Tab. 14:

Tierspezifische mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$)
von Mäuseleberzellkernen - gemessen in AE

(1 AE = 2×10^{-3} μ A bei 490 nm)

Altersklasse: 22 Monate

Färbung: Phenanthrenchinon

In Abb. 3 sind die mittleren subsummierten Extinktionswerte der Acridinorange-Färbung (Ordinate) als Funktion des Alters (Abszisse) eingezeichnet. Die abgebildete Kurve läßt ein deutliches Maximum der Fluoreszenzemissionen bei den 6 Tieren der Altersklasse 14 Monate mit einem Mittelwert von $31,1 \pm 1,7$ AE bei den 2c-Kernen erkennen. Die Werte für die 2 Monate alten Mäuse liegen mit einem Mittelwert von $16,2 \pm 1,8$ AE um ca. die Hälfte tiefer. Die 22 Monate alten Tiere zeigen einen Mittelwert von $25,2 \pm 1,0$ AE, was einer Deminution um ca. $1/5$ gleichkommt.

Analog der Kurve der Acridinorange-Färbung (Abb. 3) findet sich bei der Phenanthrenchinon-Reaktion in Abb. 4 ein Maximum der subsummierten Mittelwerte der diploiden Kernpopulation der 14 Monate alten Tiere mit $61,2 \pm 1,9$ AE. Der Mittelwert aus der Altersklasse der 2 Monate alten Tiere ist mit $15,5 \pm 1,7$ AE um etwa $3/4$, der der 22 Monate alten Tiere mit $40,6 \pm 1,1$ AE um etwa $1/3$ vermindert. Bei einem Vergleich der Abb. 3 und 4 verläuft die Acridinorange-Bindungskurve merklich flacher als die nach Phenanthrenchinon-Färbung. Die tetraploiden Kerne sind dem Verhalten der diploiden Kernkollektive angepaßt.

Die alternsabhängigen Veränderungen der Farbstoffbindungs-kapazität gehen auch aus Tab. 15 und 16 hervor.

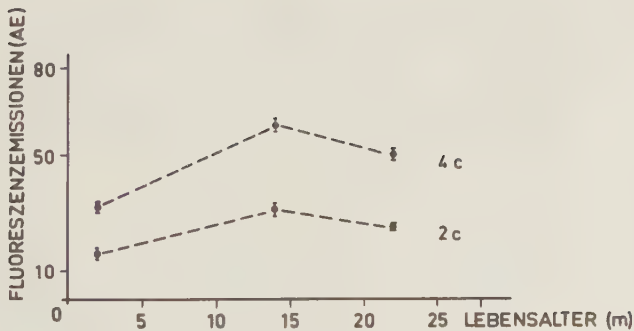


Abb. 3:

Mittlere Fluoreszenzmissionen (mit Standardabweichung) di- und tetraploider Mäuseleberzellkerne in Abhängigkeit vom Lebensalter.

Abszisse: Lebensalter in Monaten (m)

Ordinate: Fluoreszenzmission in AE ($1 \text{ AE} = 2 \times 10^{-3} \mu\text{A}$)

Färbung: Acridinorange bei pH 4,1 nach Acetylierung

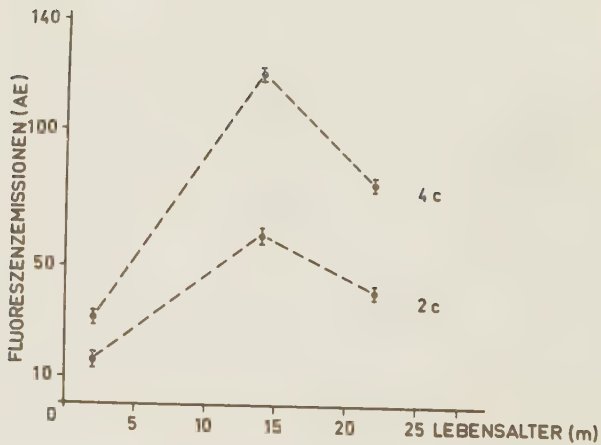


Abb. 4:

Mittlere Fluoreszenzemissionen (mit Standardabweichung) di- und tetraploider Mäuseleberzellkerne in Abhängigkeit vom Lebensalter.

Abszisse: Lebensalter in Monaten (m)

Ordinate: Fluoreszenzemission in AE ($1 \text{ AE} = 2 \times 10^{-3} \mu\text{A}$)

Färbung: Phenanthrenchinon

Lebens- alter	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
2 Monate	2c	1097	16,2	1,8	0,1	4c	95	31,8	1,4	0,2
14 Monate		362	31,1	1,7	0,1		742	60,3	2,0	0,1
22 Monate		44	25,2	1,0	0,2		964	50,2	1,6	0,1

Tab. 15:

Mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$) von Mäuseleber-
zellkernen für verschiedene Alters- und Ploidie-
klassen - gemessen in AE ($1 \text{ AE} = 2 \times 10^{-3} \mu\text{A}$ bei 530 nm)
Färbung: Acridinorange bei pH 4,1 nach Acetylierung

Lebens- alter	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Kern- klasse	Anzahl der Kerne	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
2 Monate	2c	1115	15,5	1,7	0,1	4c	71	31,1	1,6	0,2
14 Monate		351	61,2	1,9	0,1		711	119,7	1,6	0,1
22 Monate		52	40,6	1,1	0,2		937	79,9	1,6	0,1

Tab. 16:

Mittlere Fluoreszenzemissionen ($\bar{x}$) von Mäuseleber-
zellkernen für verschiedene Alters- und Ploidie-
klassen - gemessen in AE ($1 \text{ AE} = 2 \times 10^{-3} \mu\text{A}$ bei 490 nm)
Färbung: Phenanthrenchinon

DISKUSSION

Morphogenese, Differenzierung und physiologisches Altern werden durch molekulare Prozesse auf der Ebene der DNA bestimmt (v. HAHN 1971). Im Verlauf der Ausdifferenzierung einer somatischen Zelle kommt es zu einer permanenten, vermutlich irreversiblen Repression großer Bezirke des Genoms (ALLFREY et al. 1962; v. HAHN 1966). An dem geringen verbleibenden Teil funktionell aktiven Chromatins (ca. 30%), für jeden Zelltyp verschieden, vollzieht sich unter dem Einfluß eines inadäquaten oder inkongruenten Milieus der Zelle in bisher nicht genau definierter Weise ein physiologischer Alternsprozess (BASTAI 1955). Dieser drückt sich in einer Abnahme der Adaptionsfähigkeit der Zelle an endogene und exogene Belastungen (v. HAHN 1970), in einem Verlust der Regenerationsfähigkeit (PAULINI et al. 1971a) sowie in biochemisch nachweisbaren Strukturveränderungen an den biologischen Makromolekülen des Zellkerns aus (v. HAHN 1963a,b; 1964/65a,b). Aus diesen Beobachtungen resultieren zahlreiche fundamentale und epiphenomenale Alternstheorien, wobei VERZAR (1971) den Begriff des Alterns auf makromolekularer Ebene prägte. Er sprach damit in erster Linie das Altern der DNA als Träger der genetischen Information an. Alternsbedingte Veränderungen an der DNA sind wiederholt berichtet worden. So beschreibt z.B. BUEGER (1960) eine Zunahme des mittleren DNA-Gehaltes diploider Interphasekerne im menschlichen Gehirn mit steigendem Individualalter. Auch unsere Ergebnisse der Feulgen-Nukleal-Reaktion scheinen auf den ersten Blick darauf hinzudeuten, denn zwischen dem zweiten und 14. Lebensmonat kommt es bei unseren Fluoreszenz-emissionsuntersuchungen, bezogen auf die mittlere Extinktion der diploiden Kerne aller 2 Monate alten Mäuse, zu einer Steigerung der Meßwerte um etwa 37 %. Jenseits

des 14. Lebensmonats ist eine Änderung der Feulgen-Werte dagegen nicht mehr gegeben. Die Beurteilung der Ergebnisse muß jedoch kritisch erfolgen, da eine Reihe von Faktoren einen entscheidenden Einfluß auf die Feulgen-Hydrolyse ausüben. In diesem Zusammenhang wird einmal ein durch die Alkoholfixierung bedingter Proportionalitätsfehler (BÖHM, SPRENGER, SCHLÜTER und SANDRITTER 1968), zum anderen eine Differenz im Protein- und Wassergehalt der Zelle sowie ein unterschiedlicher Konzentrations- und Kondensationsgrad der DNA diskutiert (DENKHAUS et al. 1969; NOESKE 1969). Man wird mithin wohl annehmen müssen, daß die unterschiedlichen Feulgen-Werte nicht Ausdruck eines unterschiedlichen DNA-Gehaltes sind. Dies steht in Übereinstimmung mit der molekulargenetischen Erkenntnis einer Konstanz der primär genetischen Matrix im Lauf des Alterns, was durch biochemische und zytophotometrische Methoden nachgewiesen worden ist (FALZONE et al. 1959; ENESCO 1967; DENKHAUS 1970). Die von einigen Autoren beschriebene alternsabhängige Steigerung der H^3 -Thymidin Inkorporationsrate in die Rattenleber (FALZONE et al. 1967; POST und HOFFMANN 1964) ist offensichtlich als Reparaturmechanismus zu deuten, der die DNA-Konstanz bewahren soll (ENESCO 1967).

Dagegen stellt die Polyploidisierung eine echte Zunahme des DNA-Gehaltes dar, wobei zwischen einer juvenilen differenzierungsbedingten und einer alternsabhängigen Polyploidisierung unterschieden werden muß. Letzterer Vorgang führt jedoch nicht zur Erholung der Biosyntheseleistung der Zelle, sondern hat eine Behinderung des genetischen Informationsflusses und der Mitose zur Folge (LINDNER 1972). Die dargestellten Fluoreszenzhistogramme der Mäuseleberzellkerne stehen im Einklang mit dem in der Literatur bekannten Befund der alternsabhängigen Veränderung

vom juvenilen eintönig diploiden Kernbild zum höherploidem Kernmuster (ALTMANN et al. 1966b; SCHMITT, BENEKE und ENDRES 1971; SCHULTE-HERMANN et al. 1968; PAULINI et al. 1971; NAGY et al. 1969). Diese Bewegung des hepatozellulären Karyogrammes hat die Ausbildung einer tetraploiden "Regelklasse" (MÜLLER 1966) zur Folge, wobei die 4c-Kerne 58% bzw. 78% der Kernpopulation bei den 14 und 22 Monate alten Tieren ausmachen.

Die Polyploidisierung ist begleitet von einer vermutlich irreversiblen Heterochromatisierung, die eine Veränderung des schnell hydrolisierbaren, nicht kondensierten Euchromatins in langsam hydrolisierbares, kondensiertes Heterochromatin bedingt (SANDRITTER et al. 1967; DENKHAUS et al. 1969). In Zusammenhang mit einer gegenüber dem Euchromatin verminderten Aktivität des Heterochromatins nach H^3 -Uridin Einbau interpretierte SANDRITTER (1970) die Heterochromatisierung als morphologisches Äquivalent eines Verlustes verfügbarer genetischer Information. Dieser Informationsschwund drückt sich, wie VÖLKER (1974) bei alten Mäusen nachweisen konnte, auch in einer gegenüber jungen Tieren geringeren kortisoninduzierbaren Freisetzung genetisch aktiver Stellen des Chromatins von Leberzellkernen aus. Obgleich der makromolekulare Bau des Heterochromatins bis heute nur ungenügend bekannt ist, deutet manches darauf hin, daß es innerhalb des Chromatingerüsts zu einem Verlust sterisch freier Anionengruppen kommt, was eine dichtere Packung der Chromatinstrukturen ermöglicht (GLEDHILL et al. 1966). Möglicherweise erfolgt die Reduktion der anionischen DNA-Gruppen über Etablierung elektrostatischer Bindungen zwischen den kationischen Aminogruppen der verschiedenen Histonfraktionen und den DNA- PO_4 -Gruppen (GLEDHILL et al. 1966; ALLFREY 1971). Diese Anionen-Gruppen

hält man für die aktiven Bestandteile der genetischen Matrix, die auf die Matritzenaktivität der DNA regulierend einwirken (HUANG und BONNER 1962; FRENSTER 1965a,b). Die histochemische Darstellung solcher reaktiver "freier" DNA- PO_4 -Gruppen vollzieht sich über ihre Anfärbbarkeit mit dem basischen Farbstoff Acridinorange, wobei durch Senkung des pH-Wertes des Färbemilieus und Acetylierung kompetitive Anionen und Kationen blockiert werden (RIGLER 1966; DENKHAUS und HEIMER 1970). So scheint es möglich, von der Farbstoffbindungskapazität des DNP auf den jeweiligen funktionellen Zustand des DNP-Komplexes zu schließen (RIGLER 1966; DARZYNKIEWICZ et al. 1969; RIGLER et al. 1969; RINGERTZ und BOLUND 1969). In diesem Zusammenhang stehen die Ergebnisse von RINGERTZ und Mitarbeiter (1970), die in Abhängigkeit vom Wachstum der a 9 Zellkultur von Mäusefibroblasten einen signifikanten Anstieg des pro DNA-Einheit gebundenen AO-Farbstoffes bei gleichzeitig gesteigerter RNA-Biosynthese beobachteten. Der Nachweis einer strengen zeitlichen Korrelation zwischen dem Anstieg der Farbstoffbindungskapazität des DNP von Interphase-Rattenleberzellkernen für das basische Reagenz Acridinorange mit einer signifikant erhöhten Polysomen-de novo-Kondensation ist LÖHR und MÜLLER (1974 a, b), MÜLLER et al. (1974) und LÖHR et al. (1974) am Modell der hormoninduzierten RNA de novo Biosynthese gelungen. Aus ihren Untersuchungen ist zu schließen, daß dem Anstieg der hormoninduzierten m-RNA de novo Biosynthese eine Freisetzung von DNA- PO_4 -Gruppen parallel geht. Aus unseren Untersuchungen mit der Acridinorange-Reaktion ergibt sich eine bemerkenswerte Differenz der AO-Bindungskapazität des Nucleoproteinkomplexes von 2 und 14 Monate alten Mäusen. Es drückt sich hier eine Verdoppelung der freien DNA- PO_4 -Gruppen der 14 Monate alten gegenüber

den 2 Monate alten Mäusen aus. Unter Berücksichtigung der oben zitierten Autoren ergibt sich zwischen dem 2. und 14. Monat eine kontinuierliche Derepression zuvor blockierter Gene. Mit dem Überschreiten des 14. Lebensmonats kommt es zu einer Abnahme der Farbstoffbindungskapazität vermutlich infolge von Ausbildung stabilerer Bindungen zwischen der DNA und den ihr angegliederten nukleären basischen Proteinen. LÖHR und HEIMER (1973) interpretierten eine solche von ihnen an menschlichen Leberzellkernen beobachtete Reduktion der AO-Bindungskapazität als Ausdruck eines altersabhängig erhöhten Repressionsgrades der Funktionsstrukturen des Zellkerns.

Daß Histone eine Repressionswirkung auf die DNA Transkription besitzen, ist durch in vivo und in vitro Versuche gesichert (VERZAR 1971). Deshalb könnte man altersabhängige quantitative und (oder) qualitative Veränderungen der Histone vermuten. Aus unseren Ergebnissen ergibt sich für den Gesamthistongehalt ein Anstieg zwischen dem 2. und 14. Lebensmonat. Die Auswertung dieses Befundes muß jedoch wie bei der Feulgen-Färbung unter Berücksichtigung des Einflusses der angewandten Präparationsmethode erfolgen. Außerdem stellen die Histone mit einem Turn - over von 3 % pro Tag (BUSCH 1965) einen metabolisch relativ trägen Kernbaustein mit einer auffallenden Strukturmonotonie dar. Dementsprechend bleibt in der adulten Lebensphase zwischen dem 14. und 22. Lebensmonat in unseren Untersuchungen der Histongehalt unverändert. Qualitative Veränderungen im Spektrum der Histonfraktionen sind jedoch wiederholt beschrieben worden. V. HAHN et al. (1969) sowie PYHTILÄ et al. (1968) konnten in ihren Untersuchungen einen altersabhängigen Verlust argininreicher Histonfraktionen feststellen.

Obwohl biochemische Charakteristika an der Rolle der Histone als genetische Repressoren zweifeln lassen, verdienen gerade die argininreichen Histone besondere Beachtung, da sie sich durch eine starke in vitro Repressionswirkung auf die DNA abhängige RNA-Biosynthese auszeichnen (ALLFREY et al. 1963). Sie lassen sich mit der Phenanthrenchinonfärbung markieren, wobei der Farbstoff eine spezifische Bindung mit den Guanidinogruppen des Arginins eingeht. Für die Resultate nach der PQ - Reaktion ergibt sich eine auffällige Parallelität zur AO-Färbung. Einem steilen Anstieg der Farbstoffbindungskapazität zwischen dem 2. und 14. Lebensmonat um das Dreifache schließt sich jenseits des 14. Lebensmonats eine Verminderung um ein Drittel an. Analog zur AO-Färbung scheint für den ascendierenden Kurventeil eine Lockerung der Histon-DNA-Bindungen mit einer Freisetzung von Histon-Argininresiduen verantwortlich zu sein. Der descendierende Kurventeil kann als alternskorreliert zunehmende Stabilisierung der DNA-Histon-Bindungen interpretiert werden, wodurch eine geringere Menge von Arginin Guanidino-gruppen zur Reaktion mit dem Farbstoff verfügbar sind (LÖHR und HEIMER, 1972). Unsere Ergebnisse fügen sich somit in die von v. HAHN (1966) dargelegte Alternatheorie ein, welche eine kontinuierliche Verfestigung der Bindungen innerhalb des Nukleoproteinkomplexes mit nachfolgendem Verlust der für die Zelle abrufbaren genetischen Information beinhaltet. Es bleibt jedoch offen, inwieweit die Abnahme anfärbbarer Argininresiduen eine Verschiebung in der Zusammensetzung der Gesamthistone ausdrückt (v. HAHN et al. 1969; v. HAHN 1971), da unsere Untersuchungsmethode darüber keine Aussage erlaubt.

Als Folgerung aus unserer experimentellen Untersuchung ergibt sich die Möglichkeit einer alternsabhängigen Variation des Funktionszustandes der genetischen Matrix,

infolge von Änderungen der Bindungsverhältnisse innerhalb des Nukleoproteidkomplexes des Mäuseleberzellkerns. Unsere Ergebnisse unterstützen damit die Alternstheorie v. HAHN's (1970), daß strukturelle Veränderungen des Nukleoproteinkomplexes einer der primären Altersmechanismen der Zelle sind. Die Ursachen dieser Erscheinung bleiben jedoch weiterhin verschlossen.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden molekularbiologische Aspekte des physiologischen Alterns am Modell von Mäuse-leberzellkernen untersucht. Dabei wurde besonders das Problem alternsabhängiger Änderungen des nukleären DNA-Gehaltes sowie deren mögliche Einflußnahme auf die Ma-trizenaktivität der DNA berücksichtigt. Zur Bestimmung des nukleären DNA-Gehaltes kam die Feulgen-Nuklealreaktion zur Anwendung. Der Gesamthistongehalt der Leberzellkerne konnte mit der Fastgreen-Methode, die sogenannten freien DNA-PO₄-Gruppen mittels der Acridinorange-Färbung, nukle-äre histonständige Argininresiduen durch Markierung mit dem Farbstoff Phenanthrenchinon erfaßt werden. Diese mikro-fluorometrischen Untersuchungen führten zu folgenden Er-gebnissen:

1. Schon sehr früh läßt sich in der Mäuseleber ein Wandel der Kernregelklasse von der diploiden zur tetra- und höherploiden Stammlinie verfolgen. Mit zunehmendem Individualalter treten außerdem außerhalb der reinen Ploidieklassen vermehrt aneuploide DNA-Werte auf.
2. Parallel zu den alternsabhängigen Änderungen des nukle-ären DNA-Gehaltes geht die Zunahme des nukleären Ge-samthistongehaltes.
3. Bei Bestimmung der Farbstoffbindungskapazität des Desoxyribonukleoproteinkomplexes für das basische Rea-genz Acridinorange diploider und tetraploider Leber-zellkerne finden sich für den 14. Lebensmonat gegenüber dem 2. Lebensmonat deutlich höhere Meßwerte, welchen geringere Meßwerte der 22 Monate alten Tiere folgen.
4. Den Emissionskurven nach Markierung der sogenannten freien DNA-PO₄-Gruppen gehen die Meßwerte der Phenanthrenchinon-Färbung parallel.

Obwohl mittels der angewandten Methodik keine Aussage über die Ursache der physiologischen Polyploidisierung und die alternsabhängigen Schwankungen der Farbstoffbindungskapazität des Desoxyribonukleoproteinkomplexes für Acridinorange und Phenanthrenchinon in der Mäuseleber gemacht werden können, erlauben die Ergebnisse der mikrofluorometrischen Bestimmung der Farbstoffbindungskapazität der Mäuseleberzellkerne für Acridinorange und Phenanthrenchinon die Vermutung, daß in Abhängigkeit vom Lebensalter und dem physiologischen Wandel der Leberzelle zur fakultativ postmitotischen Zelle eine Abnahme der induzierbaren Matrizenaktivität der nukleären DNA erfolgt. Diese Annahme findet ihre Bestätigung durch den Nachweis einer im Alter herabgesetzten Ansprechbarkeit des Genoms auf hormonelle Reize, welche eine de novo Biosynthese von m-RNA nach sich ziehen. Die vorgelegten Ergebnisse stehen in dieser Beziehung in gutem Einklang mit der von VERZAR und v. HAHN entwickelten Alternstheorie auf makromolekularer Ebene.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALFERT, M., GESCHWIND, J.J.: A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 39, 991-999 (1953)
2. ALFERT, M., GESCHWIND, J.J.: The development of polysomaty in rat liver.
Exp. Cell Res. 15, 230-232 (1958)
3. ALLFREY, V.G., LITTAU, V.C., MIRSKY, A.E.: On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 49, 414-421 (1963)
4. ALLFREY, V.G.: Functional and metabolic aspects of DNA - associated proteins.
In: PHILLIPS, D.M.P. (ed.), Histones and Nucleohistones, Plenum Press London, New York 1971, S.241-294
5. ALLFREY, V.G., MIRSKY, A.E.: Evidence for the complete DNA - dependence of RNA synthesis in isolated thymus nuclei.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 48, 1590-1596 (1962)
6. ALTMANN, H.W., LOESCHKE, K., SCHENK, K.: Über das Karyogramm der menschlichen Leber unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Virchows Arch. path. Anat. 341, 85-101 (1966b)

7. ANDREW, W.: An electron microscope study of age changes in the liver of the mouse.
Amer. J. Anat. 110, 1-18 (1962)
8. BARR, G.C., BUTLER, J.A.V.: Histones and gene function.
Nature 199, 1170-1172 (1963)
9. BASTAI, P.: Die biologischen Grundlagen des Alterns.
Z. Alternsforsch. 9, 211-219 (1955)
10. BENEKE, G., ERVIG, K., SCHMITT, W.: Polyploidisierung und Heterochromatisierung von Sehnenzellkernen in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Beitr. path. Anat. 141, 19-32 (1970)
11. BEAMS, H.W., KING, R.L.: The origin of binucleate and large mononucleate cells in the liver of the rat.
Anat. Rec. 83, 281-297 (1942)
12. BONNER, J., HUANG, R.C.: Properties of chromosomal nucleohistone.
J. molec. Biol. 6, 169-174 (1963)
13. BONNER, J.: The template activity of chromatine.
J. cell. comp. Physiol. 66, 77-90 (1965)
14. BÖHM, N., SPRENGER, E.: Fluorescence cytophotometry: A valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA.
Histochemie 16, 100-118 (1968)
15. BÖHM, N., SPRENGER, E., SCHLÜTER, G., SANDRITTER, W.: Proportionalitätsfaktor bei der Feulgen-Hydrolyse.

16. BUERGER, M.: Altern und Krankheit als Problem der Biomorphose.
Leipzig: Thieme 1960
17. BUSCH, H.: Histones and other nuclear proteins.
Academic Press New York London, S.171-190
(1965)
18. COMFORT, A.: Physiology, homeostasis and aging.
Gerontologia 14, 224-234 (1968)
19. COMFORT, A.: Basic research in gerontology.
Gerontologia 16, 48-64 (1970)
20. DARZYNKIEWICZ, Z., BOLUND, L., RINGERTZ, N.R.: Actinomycin binding of normal and phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes.
Exp. Cell Res. 55, 120-122 (1969)
21. DENKHAUS, W.: Kerngröße, DNS-Gehalt und Ploidieklassen menschlicher Leberzellen in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Z. Geront. 3, 88-96 (1970)
22. DENKHAUS, W., HEIMER, D.: Mikrofluorometrische Bestimmung der freien DNS-PO₄-Gruppen im Chromatin nativer Leberzellkerne von jungen und alten Meerschweinchen.
Gerontologia 16, 1-13 (1970)
23. DENKHAUS, W., KIEFER, G., MEUTER, P.: Untersuchungen über alternsabhängige Veränderungen der Säurelabilität des Nucleoproteids.
Virchows Arch. Abt. B. Zellpath. 3, 171-180
(1969)

24. DETWILER, T.C., DRAPER, H.H.: Physiological aspects of aging. IV. Senescent changes in the metabolism and composition of nucleic acids of the liver and the muscle of the rat. J. Geront. 17, 138-143 (1962)
25. ENESCO, H.E.: A cytophotometric analysis of DNA content of rat nuclei in aging. J. Geront. 22, 445-448 (1967)
26. FALZONE, J.A., BARROWS, CH.H., SHOCK, N.W.: Age and ploidy of rat liver nuclei as measured by volume and DNA content. J. Geront. 14, 2-8 (1959)
27. FALZONE, J.A., SAMIS, H.V., WULFF, V.J.: Cellular compensations and controls in the aging process. J. Geront. 22, 42-52 (1967)
28. FRENSTER, J.H.: Nuclear polyanions as de-repressors of synthesis of ribonucleic acid. Nature 206, 680-683 (1965a)
29. FRENSTER, J.H.: A model of specific de-repression within interphase chromatin. Nature 206, 1269-1270 (1965b)
30. GLEDHILL, B.L., GLEDHILL, M.P., RIEGLER, R., RINGERTZ, N.R.: Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. Exp. Cell Res. 41, 652-665 (1966)
31. v. HAHN, H.P.: Age dependent thermal denaturation and viscosity of crude and purified DNA prepared from bovine thymus. Gerontolog

32. v.HAHN,H.P.: The role of DNA in the aging process review
Gerontologia 8, 168-178 (1963b)
33. v.HAHN,H.P.: Analysis of histones from thymus of young
and old bovines gel filtration.
Gerontologia 10, 107-116 (1964/65a)
34. v.HAHN,H.P.: Age related alterations in the structure
of DNA II. The role of histones.
Gerontologia 10, 174-182 (1964/65b)
35. v.HAHN,H.P.: A model of regulatory aging of the cell
at the gene level.
J. Geront. 21, 291-294 (1966)
36. v.HAHN,H.P.: Genetische Faktoren im zellulären Alterns-
prozeß.
Bull.schweiz.Akad.med.Wiss. 24, 272-283 (1966)
37. v.HAHN,H.P.: Structural and functional changes in nucleo-
protein during the aging of the cell.
Gerontologia 16, 116-128 (1970)
38. v.HAHN,H.P.: Altern von Nukleoprotein.
Akt. Geront. 1, 333-336 (1971)
39. v.HAHN,H.P.: Failures of regulation mechanisms as causes
of cellular aging.
In: STREHLER, B.L., (ed.), Advances in
gerontological research, vol. 3,
Academic Press New York 1971, S. 1-38
40. v.HAHN,H.P., FRITZ,E.: Age related alterations in the
structure of DNA. III. Thermal stability of
rat liver DNA related to age, histone content
and ionic strength.
Gerontologia 12, 237-250 (1966)

41. v.HAHN,H.P., MILLER,J., EICHHORN,G.L.: Age erlated alterations in the structure of nucleoprotein. IV. Changes in the composition of whole histone from rat liver. Gerontologia 15, 293-301 (1969)
42. HEINE,H.: Der Ultrapack. Z. wiss. Mikr. 48, 450-465 (1931)
43. HIMES,M., HOFFMAN,J., POLLISTER,A.W., POST,J.: Origin of polyploid nuclei in rat livers during regeneration following carbon tetrachloride poisoning. J. Mt Sinai Hosp. 24, 935-938 (1957)
44. HRACHOVEC,J.P.: Age changes in amino acid incorporation by rat liver microsomes. Gerontologia 15, 52-63 (1969)
45. HUANG,R.CH.C., BONNER,J.: Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 48, 1216-1222 (1962)
46. ISCHIMURA,S., ZAMA,M., FUJITA,H.: The nature of strong binding between acridine-orange and deoxyribonucleic acid as revealed by equilibrium dialysis and thermal renaturation. Biochim. biophys. Acta 190, 116-125 (1969)
47. JACOB,F., MONOD,J.: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of protein. J. molec. Biol. 3, 318-356 (1961)
48. JACOBJ,W.: Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. Wilhelm Roux'Arch.Entwickl.-Mech.Org.106, 124-192 (1925)

49. LINDNER, J.: Altern des Bindegewebes.
In: Hdb. allg. Path., Bad. VI/4 245-368
Berlin Heidelberg New York 1972
50. LÖHR, J., HEIMER, D.: Zytophotometrische Untersuchung
über altersabhängige Strukturveränderungen
am Nucleoproteinkomplex von Leberzellkernen.
Gerontologia 18, 122-130 (1972)
51. LÖHR, J., HEIMER, D.: Mikrofluorometrische Bestimmung der
freien DNS-PO₄-Gruppen im Chromatin mensch-
licher Leberzellkerne in Abhängigkeit vom
Lebensalter.
Akt. Geront. 3, 325-331 (1973)
52. LÖHR, J., MÜLLER, W.E.G., ZAHN, R.: The influence of hydro-
cortison acetate on the course of the
phenanthrenquinone reaction during the RNA-
synthesis in the interphase nuclei from rat
liver cells.
10th Int.Congr.Int.Acad.Path.: Post-congress
symposium "DNA and Pathology" 21.9.-24.9.1974
Freiburg/BrsG., im Druck
53. LÖHR, J., MÜLLER, W.E.G.: Zur Kinetik der Acridinorange-
Reaktion bei der cortisoninduzierten RNA
Biosynthese in der Rattenleber.
XVII. Symposium der deutschen Gesellschaft
für Histochemie, Bozen, 5.10.1974a, im Druck
54. LÖHR, J., MÜLLER, W.E.G.: Zum Einfluß des Trijodthyronins
auf die RNA Biosynthese in der Rattenleber.
5. Herbsttagung der deutschen Gesellschaft
Pathologie, Mainz 12.10.1974b, im Druck

55. MAGUN, B.E., KELLY, J.W.: A new fluorescent method with phenanthrenquinone for the histochemical demonstration of arginin residues in tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 17, 821-827 (1969)
56. MEDVEDEV, Z.A.: The nucleic acids in development and aging
In: STREHLER, B.L., (ed.), *Advances in gerontological research*, vol.1, Academic Press
New York 1964, pp. 181-206
57. MÜLLER, H.A.: Experimentell erzeugte Änderungen der organ-spezifischen Kernstrukturen in der Mäuseleber.
Verh. dtsh. Ges. Path. 48, 200-203 (1964)
58. MÜLLER, H.A.: Die Chromozentren in den Leberzellkernen der Maus unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Ergeb. allg. Path. path. Anat. 47, 144-185 (1966)
59. MÜLLER, D.: Erfahrungen mit der Feulgen-Färbung für quantitative zytochemische DNS-Untersuchungen.
Histochemie 7, 96-102 (1966)
60. MÜLLER, W.E.G., LÖHR, J., ZAHN, R.: Biochemical and cytophotometrical determination of the free DNA-PO₄-groups in interphase nuclei from rat liver during induction of RNA synthesis by triiodothyronine.
10th Int. Congr. Int. Acad. Path.:
Post-congress symposium "DNA and Pathology"
21.9.-24.9.1974 Freiburg/Brsg., im Druck
61. NADAL, C., ZAJDELA, F.: Poliploidie somatique dans le foie de rat. I. Le role des cellules binucléés dans la g n se des cellules poliploides.
Exp. Cell Res. 42, 99-116 (1966)

62. NAGY, I., v. HAHN, H. P., VERZAR, F.: Age related alterations in the cell nuclear and the DNA content of rat tail tendon.
Gerontologia 15, 258-264 (1969)
63. NAORA, H.: Microspectrophotometry of cell nuclei stained with the Feulgen reaction. IV. Formations of tetraploid nuclei in rat liver cells during post-natal growth.
J. biophys. biochem. Cytol. 3, 949-975 (1957)
64. NOESKE, K.: Die Zusammensetzung der Zellkernproteine und ihre Beziehung zum DNS-Gehalt im Verlauf der normalen Myelo- und Erythropoese beim Menschen.
Habil.-Schrift Gießen 1968
65. NOESKE, K.: Diskrepanzen von Feulgen-Wert und DNS-Gehalt.
Histochemie 20, 322-327 (1969)
66. PAULINI, K., BENEKE, G., PAUKNER, U.: Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie in Abhängigkeit vom Lebensalter (Zytophotometrische Untersuchungen).
Akt. Geront. 1, 447-516 (1971)
67. PAULINI, K., BENEKE, G., KULKA, R.: Leberregeneration nach partieller Hepatektomie in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Z. Geront. 4, 141-153 (1971a)
68. POST, J., HOFMAN, J.: Changes in the replication times and pattern of the liver cells during the life of the rat.
Exp. Cell Res. 36, 111-117 (1964)

69. PYHTILÄ, M.J., SHERMAN, F.G.: Studies on the histones and DNA of calf and old cow thymus.
J.Geront. 23, 450-453 (1968)
70. RICHARDS, B.M., PARDON, J.F.: The molecular structure of nucleohistone.
Exp.Cell Res. 62, 184-196 (1970)
71. RIGLER, R.J.: Microfluorometric characterisation of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by Acridinorange.
Acta physiol. scand. 67, suppl.267, 1-123 (1966)
72. RIGLER, R., KILLANDER, D., BOLUND, L., RINGERTZ, N.R.: Cytochemical characterisation of deoxyribonucleoprotein in individual cell nuclei.
Exp. Cell Res. 55, 215-224 (1969)
73. RINGERTZ, N.R., BOLUND, L.: Activation of hen erythrocyte deoxyribonucleoprotein.
Exp. Cell Res. 55, 205-214 (1969)
74. RINGERTZ, N.R., BOLUND, L., DARZYNKIEWICZ, Z.: AO-binding of intracellular nucleic acids in fixed cells in relation to cell growth.
Exp. Cell Res. 63, 233-238 (1970)
75. SANDRITTER, W.: Funktionsstrukturen des Zellkerns.
Med. Welt I, 1-10 (1970)
76. SANDRITTER, W., KIEFER, G., SCHLÜTER, G., MOORE, W.: Eine zytophotometrische Methode zur Objektivierung der Morphologie von Zellkernen.
Histochemie 10, 341-352 (1967)

77. SCHMITT, W., BENEKE, G., ENDRES, R.: Die Bindegewebsproliferation in Abhängigkeit vom Alter.
Beitr. path. Anat. 144, 272-280 (1971)
78. SCHULTE-HERMANN, R., SCHLICHT, I., THOM, R., KORANSKY, W.: Zahl und Ploidiegrad der Zellkerne der Leber unter dem Einfluß körperfremder Stoffe.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 261, 42-58 (1968)
79. SWARTZ, F. J.: The development in the human liver of multiple desoxyribose nucleic acid classes and their relationship to the age of the individual.
Chromosoma 8, 53-72 (1956)
80. VERZAR, F.: Primäres Altern von Makromolekülen.
Akt. Geront. 1, 518-523, 615-623 (1971)
81. VERZAR, F.: Die Rolle der experimentellen Forschung für die Gerontologie.
Akt. Geront. 1, 63-68 (1971)
82. VÖLKER, E.: Die Kinetik der Acridinorange-Reaktion bei der hormoninduzierten RNA Biosynthese in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Inauguraldissertation Mainz, in Vorbereitung.
83. VOROBYEV, V. I.: The effect of histones on RNA and protein synthesis in the sea urchin embryos at early stages of development.
Exp. Cell Res. 55, 168-170 (1969)

Lebenslauf

Am 2. Juli 1949 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Josef Himmelsbach und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Dees, in Lahr/Schwarzwald geboren.

Von Ostern 1956 bis Ostern 1960 besuchte ich die Grundschule in Ettenheim, daran anschließend das naturwissenschaftliche Gymnasium in Ettenheim, wo ich am 28. Juni 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Mit dem Wintersemester 1968/69 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelmsuniversität Münster/Westfalen. Am 26. September 1969 legte ich die naturwissenschaftliche, am 19. April 1971 die ärztliche Vorprüfung an der Universität Münster ab.

Zum Wintersemester 1971/72 wechselte ich an die Johannes Gutenberg-Universität Mainz, wo ich am 21. Juni 1974 die ärztliche Prüfung bestand.

Am 1. August begann ich meine Tätigkeit als Medizinalassistent am hiesigen Pathologischen Institut.

Vom Wehrdienst bin ich bis einschließlich 1975 zurückgestellt. Am 1. Juni 1973 heiratete ich meine Frau Marlies, geb. Jansen, cand.phil.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. J. Löhr für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und seine hilfreiche Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. W.E.G. Müller danke ich für die freundliche Ausarbeitung des Korreferates.

Auch Herrn Dipl.-Math. Mau vom Institut für Medizinische Statistik sei an dieser Stelle für sein freundliches Bemühen gedankt.

